

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年9月18日 (18.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/076639 A1

(51) 国際特許分類: C12P 17/18, 17/14, C07D 265/38, 498/04, A61K 31/5383, A61P 19/02, 19/10, 29/00, 35/00, 35/04, 43/00 // (C12N 1/14, C12P 17:18) (C12R 1:645, C12P 17:14, C12R 1:645) (C12N 1/14, C12R 1:645)

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02633

(22) 国際出願日: 2003年3月6日 (06.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ: 特願2002-63046 2002年3月8日 (08.03.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): メルシャン株式会社 (MERCIAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒104-8305 東京都 中央区 京橋 1 丁目 5 番 8 号 Tokyo (JP). 財団法人微生物化学研究会 (ZAI DAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI) [JP/JP]; 〒141-0021 東京都 品川区 上大崎 3 丁目 14 番 23 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 熊谷 博行 (KUMAGAI,Hiroyuki) [JP/JP]; 〒253-0035 神奈川県 茅ヶ崎市 浜須賀 11-5 Kanagawa (JP). 鮫島 朋宏 (SAMESHIMA,Tomohiro) [JP/JP]; 〒251-0052 神奈川県 藤沢市 藤沢 1-3-7-5 O 1 Kanagawa (JP). 松藤 素子 (MATSU FUJI,Motoko) [JP/JP]; 〒201-0005 東京都 狛江市 岩戸南 3-23-5 Tokyo (JP). 河村 直人 (KAWAMURA,Naoto) [JP/JP]; 〒242-0007 神奈川県 大和市 中央林間 6-2-1-207 Kanagawa (JP). 一色 邦夫 (ISHIKI,Kunio) [JP/JP]; 〒228-0015 神奈川県 座間市 南栗原 2-2-17 Kanagawa (JP). 井

上 裕幸 (INOUE,Hiroyuki) [JP/JP]; 〒411-0044 静岡県 三島市 徳倉 772-10 Shizuoka (JP). 染野 哲也 (SOMENO,Tetsuya) [JP/JP]; 〒330-0825 埼玉県 さいたま市 東新井 710-5016-201 Saitama (JP). 石塚 雅章 (ISHIZUKA,Masaaki) [JP/JP]; 〒145-0072 東京都 大田区 田園調布本町 3-17 Tokyo (JP). 竹内 富雄 (TAKEUCHI,Tomio) [JP/JP]; 〒108-0073 東京都 港区 三田 2-19-10-502 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 大家 邦久 (OHIE,Kunihisa); 〒103-0013 東京都 中央区 日本橋人形町 2 丁目 2 番 6 号 堀口第 2 ビル 7 階 大家特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

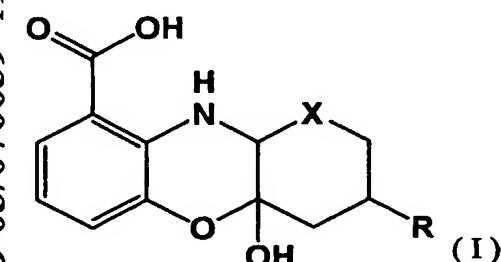
(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: OSTEOCLAST DIFFERENTIATION INHIBITORS

(54) 発明の名称: 破骨細胞分化抑制物質

(57) Abstract: Compounds represented by the following general formula (I); a process for producing a compound (substance F-1490) of the general formula (I), wherein X represents -O- and R represents hydroxy, by using a microorganism belonging to the genus *Cunninghamella*; a *Cunninghamella* sp. F-1490 strain (FERM BP-8287) capable of producing the substance F-1490; and osteoclast differentiation inhibitors comprising the compounds represented by the general formula (I) as the active ingredient: (I) wherein X represents -O- or -CH₂-; R represents hydroxy or hydrogen in the cases where X is -O- or -CH₂- respectively.

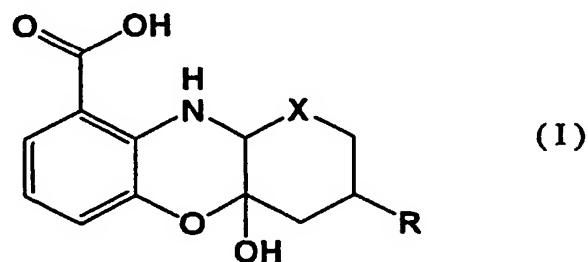
WO 03/076639 A1

[統葉有]



(57) 要約:

式 (I) で示される化合物、カニングハメラ (*Cunninghamella*) 属に属する微生物を用いる式 (I) 中の X が -O- を表わし R が水酸基を表わす化合物 (F-1490 物質) の製造方法、F-1490 物質を生産する能力を有するカニングハメラ・エスピー (*Cunninghamella* sp.) F-1490 株 (FERM BP-8287) 、及び式 (I) で示される化合物を有効成分とする破骨細胞分化抑制剤。



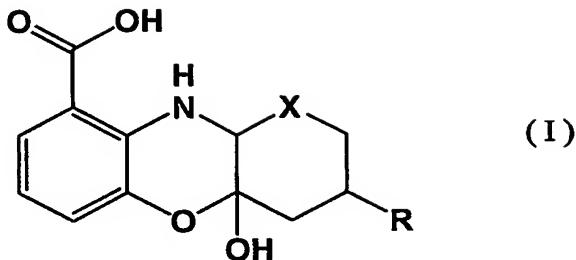
(式中、X は -O- または -CH₂- を表わし、R は、X が -O- のときは水酸基を表わし、X が -CH₂ のときは水素原子を表わす。)

明細書

破骨細胞分化抑制物質

5 技術分野

本発明は、式 (I)



(式中の記号は後記と同じ意味を表わす。) で示される化合物、カニングハメラ (Cunninghamella) 属に属する微生物を用いる式 (I) 中の X が -O- を表わし R が水酸基を表わす化合物 (F-1490 物質) の製造方法、F-1490 物質を生産する能力を有するカニングハメラ・エスピー (Cunninghamella sp.) F-1490 株 (FERM BP-8287) 、及び式 (I) で示される化合物を有効成分とする破骨細胞分化抑制剤に関する。

15 背景技術

破骨細胞は、骨髄細胞から分化して生成する細胞であり、乳がんなどのがん細胞の骨転移、リウマチ性関節炎あるいは骨粗鬆症など、数多くの疾患に関わっていることが知られている。従って、骨髄細胞から破骨細胞への分化を抑制することができれば、前述した疾患に対して、優れた治療効果を挙げることができると考えられる。そこで毒性が低くかつ骨髄細胞から破骨細胞への分化抑制作用が強い物質の開発が望まれているが、現在、微生物由来の低分子物質にはこのような性質をもつ物質の報告はない。

発明の開示

本発明の課題は、毒性が低く、かつ破骨細胞分化抑制作用を有する新規な化合物、それらの製造方法、その化合物を生産する能力を有する新規な微生物及びその化合物を有効成分とする破骨細胞分化抑制剤を提供することにある。

5

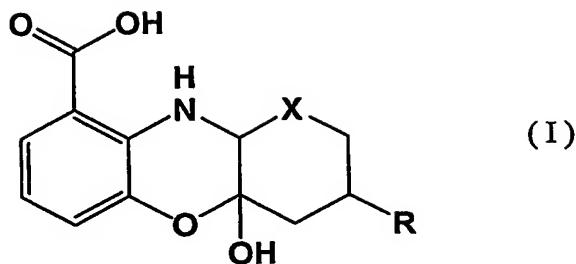
なお、本明細書において、「破骨細胞分化抑制」の用語は骨髄細胞から破骨細胞への分化を抑制することを意味する。

本発明者らは、上記課題を解決するため、各地の土壤から微生物を分離し、それらが生産する代謝産物について研究を重ねた結果、新たに分離したカニンギハメラ (Cunninghamella) 属に属する微生物が、破骨細胞分化抑制活性を示す物質を培養液中に生産していることを見出した。その培養液から有効物質を分離精製し、その物理化学的性質を調べたところ、得られた有効物質は、いかなる既知物質とも相違する後記の式 (I) で示される新規化合物であり、かつ優れた破骨細胞分化抑制活性を有することを確認した。

15 また、本発明者らは、式 (I) の化合物に構造類似の、式 (II) で示される新規類縁体化合物を合成して、その性質を調べたところ、同様に低濃度で破骨細胞分化抑制活性を有することを確認し、これらの知見に基づいて本発明を完成した。

すなわち、本発明は、下記の破骨細胞分化抑制活性を示す新規化合物またはその塩、それら化合物の製造方法、その化合物を生産する微生物、それら化合物を有効成分とする薬剤に関する。

1. 式 (I)



(式中、Xは—O—または—CH₂—を表わし、Rは、Xが—O—のときは水酸基を表わし、Xが—CH₂のときは水素原子を表わす。) で示される化合物またはその塩。

- 5 2. 式 (I) 中のXが—O—を表わし、Rが水酸基を表わす前項1に記載の化合物またはその塩。
3. 式 (I) 中のXが—CH₂—を表わし、Rが水素原子を表わす前項1に記載の化合物またはその塩。
4. カニングハメラ (Cunninghamella) 属に属し、前項2記載の化合物を生産する能力を有する微生物を培養して、その培養物から前項2記載の化合物を採取することを特徴とする前項2記載の化合物の製造方法。
5. 前項2記載の化合物を生産する能力を有するカニングハメラ・エスピー (Cunninghamella sp.) F-1490 株 (FERM BP-8287)。
6. 前項1記載の化合物またはその塩を有効成分とする破骨細胞分化抑制剤。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者らは、式 (I) で示される化合物のうちXが—O—を表わし、Rが水酸基を表わす化合物を、F-1490 物質と命名した。

- F-1490 物質は、その分子式、物理化学的性質及び構造上の特徴によって、既知の化合物と明確に区別される新規物質である。
- なお、本発明の F-1490 物質の塩としては、製薬上許容される塩基（無機塩基及び有機塩基）との塩、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウ

ム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アルミニウム塩等の無機塩基との塩、塩基性アミノ酸（例えば、アルギニン、リジン等）との塩などが例示される。

さらに本発明は、カニングハメラ (*Cunninghamella*) 属に属し、破骨細胞の分化抑制活性を示す F-1490 物質を生産する能力を有する微生物を培養し、培養物から該物質を採取する該物質の製造方法、F-1490 物質を生産する能力をもつカニングハメラ (*Cunninghamella*) 属に属する微生物、並びに F-1490 物質を有効成分とする破骨細胞分化抑制剤を提供するものである。

本発明に使用される微生物は、カニングハメラ (*Cunninghamella*) 属に属し、本発明の F-1490 物質を生産する能力を有する菌株であれば、どのようなもの 10 でも使用できる。そのような微生物の探索は、例えば以下のようにして行なうことができる。骨髄細胞の培養液に種々の微生物培養液の抽出液を加え、破骨細胞への分化の指標である酒石酸耐性酸性フォスファターゼ陽性細胞数を測定する。この細胞数が減少する、すなわち破骨細胞への分化が抑制された微生物の培養液から活性物質を単離、確認することにより、目的の F-1490 15 物質を生産する能力をもつ微生物を得ることができる。

そのようにして見出された微生物として、例えば、本発明者らが土壌から分離したカニングハメラ (*Cunninghamella*) 属に属する F-1490 株を挙げることができるが、この菌株に限らず、カニングハメラ (*Cunninghamella*) 属に属し、本発明の F-1490 物質を生産する能力を有する菌株であれば、それらの変異株、例えば、紫外線、エックス線、放射線、薬品等の変異処理により取得 20 できる人工変異株ならびに自然変異株も含めて、すべて本発明に使用することができる。

以下、F-1490 株の菌学的性状を説明する。

本菌株をポテトデキストロースアガ (Potato Dextrose Agar : 以下 PDA 25 と記す) 、モルトエキスアガ (Malt Extract Agar : 以下 MEA を記す。) 、オートミールアガ (Oatmeal Agar : 以下 OA と記す。) に接種し、25 °C

で培養した結果、全ての寒天プレート上において菌糸は羊毛状で当初白色 (white) (A 1) を呈し、後に黄白色 (yellowish white) (4 A 2) を経てクリーム色 (cream) (4 A 3) を呈する。

生育速度は極めて速く、3日間の培養条件下で全てのプレートにおいて直徑 8.5 mm のシャーレ全面に達し、1週間後にはシャーレのふたを持ち上げるほどの旺盛な生育を示す。また、全てのプレートにおいて可溶性色素の產生は認められない。なお、色調に関する記述は「メチューン・ハンドブック・オブ・カラー [Methuen Handbook of Colour (Kornerup&Wanscher, 1978)] に従った。

形態的特徴として、光学顕微鏡により特徴的な胞子囊柄 (sporangiophore) のみが観察され、胞子囊果 (sporocarp) は確認されない。気中菌糸に隔壁は極めて少なく、ほふく枝 (stolon) を有し、仮根 (rhizoid) の形成も確認される。胞子囊柄はほふく枝などの気中菌糸より単生する。柄 (stipe) は平滑で、直線的な生育をする。先端に頂嚢 (vesicle) を有し、その下方に不規則ないしは輪生した分枝 (branching) が観察される。分枝の先端にも小型の頂嚢を有する。頂嚢は亜球形から卵円形で幅は先端部のもので 3.0 μ m、分枝したもので最大が 2.0 μ m となる。胞子囊 (sporangium) 及び分節胞子囊 (merosporangium) を有さず、頂嚢表面より一胞子性の小胞子囊 (sporangiolum) のみを生じる。小胞子囊は球形 (globese) ないしは楕円形 (ellipsoidal) で、大きさは 6 ~ 9 μ m となる。褐色を呈し、表面は短い針状 (short-echinulate) となり、条線 (stria) は観察されない。

以上の菌学的性質から本発明者らは本菌株をカニングハメラ (Cunninghamella) 属に属すると判断し、本菌株をカニングハメラ・エスピー (Cunninghamella sp.) F-1490 と命名し、平成 13 年 10 月 2 日付で、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに FERM P-18548 の受託番号で寄託し、平成 15 年 1 月

31日付で、FERM BP-8287番号の国際寄託に移管した。

本発明のF-1490物質は上記菌株を栄養源含有培地に接種し、好気的に培養することにより製造される。F-1490物質の生産菌としては、カニングハメラ属に属し、F-1490物質を生産する能力を有するものであれば、上記菌株に限らず全て本発明に利用できる。

上記微生物の培養方法は、原則的には一般微生物の培養方法に準ずるが、通常は液体培養による震盪培養、通気攪拌培養等の好気的条件下で実施するのが好ましい。培養に用いられる培地としては、カニングハメラ属に属する微生物が利用できる栄養源を含有する培地であればよく、各種の合成、半合成培地、天然培地などいずれも利用可能である。培地組成として、炭素源としてのグルコース、シュークロース、フルクトース、グリセリン、デキストリン、澱粉、糖蜜等を単独または組み合わせて用いることができる。窒素源としてはファーマメディア、ペプトン、肉エキス、大豆粉、カゼイン、アミノ酸、酵母エキス、尿素等の有機窒素源を単独または組み合わせて用いることができる。その他、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩化コバルト等の塩類、重金属塩、ビタミンB及びビオチン等のビタミン類も必要に応じ、添加使用することができる。

なお、培養中発泡が著しい場合には、各種消泡剤を適宜培地中に添加することもできる。消泡剤の添加にあたっては、目的物質の生産に悪影響を与えない濃度とする必要がある。培地のpHは5~9程度、通常中性付近するのが望ましい。培養温度は、通常10~40°C、好ましくは20~27°Cに保つのがよい。培養日数は2~14日程度で、通常3~5日である。上述した各種の培養条件は、使用微生物の種類や特性、外部条件等に応じて適宜変更でき、最適条件を選択できるのはいうまでもない。培養液中に蓄積された本発明のF-1490物質はろ過、遠心分離等の既知の通常の固液分離手段によつ

て菌体を分離し、そのろ液からの抽出により回収可能である。

F-1490 物質の分離、精製は、公知の種々の方法を選択、組み合わせて行なうことができる。例えば、酢酸エチル、n-ブタノール等を用いた溶媒抽出や、アンバーライト XAD (ローム・アンド・ハース社製)、ダイヤイオン 5 HP-20 (三菱化学社製) 等のポリスチレン系吸着樹脂、シリカゲル、アルミナ、活性炭などの担体を用いるカラムクロマトグラフィーによる方法を用いることができる。これらの担体から目的物質を溶出させる方法は、担体の種類、性質によって異なるが、一例として、ポリスチレン系吸着樹脂の場合には、溶出溶媒として、含水アルコール、含水アセトン等を用いることができる。さらにセファデックス (Sephadex) LH-20 (ファルマシア社製)、バイオ・ゲル P-2 (バイオ・ラッド社製) 等によるゲルろ過、シリカゲル、アルミナ等による薄層クロマトグラフィー、順相あるいは逆相カラムを用いた分取用高速液体クロマトグラフィー (分取 HPLC) 等を用いることができる。これら的方法を単独または適宜組み合せて、場合によっては反復使用 15 することにより、分離、精製することができる。

以上のようにして得られる F-1490 物質は以下に示す物理化学的性質を有する。

- (1) 形状：白色粉状、
- (2) 分子式： $C_{12}H_{13}NO_6$ 、
20 (高分解能 FAB マススペクトロメトリーによる $C_{12}H_{14}NO_6$ の計算値 m/z:268.0821($M+H$)⁺ 実測値 m/z:268.0861)、
- (3) 比旋光度： $[\alpha]_D^{22} -57.5^\circ$ (c 0.4, メタノール)、
- (4) 融点：125～131°C (dec.)、
- (5) 赤外部吸収スペクトル：KBr 法で測定した結果は、図 1 のとおりである。また特徴的な吸収は次のとおりである。

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3380, 1680, 1620, 1500, 1440, 1375, 1260,

1090, 1035。

(6) 紫外部吸収スペクトル：メタノール中で測定した結果は、図2のとおりである。また特徴的な吸収は次のとおりである。

UV λ_{max} nm : 217, 245(sh), 328。

5 (7) 溶解性：酢酸エチル、メタノール、ジメチルスルホキシド、水に易溶、ヘキサンに難溶。

(8) ^1H —核磁気共鳴スペクトル：重ピリジンに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した結果は図3のとおりである。また各シグナルの化学シフト、多重度、スピンドル結合定数は次のとおりである。

10 δ 8.01 (1H, dd, $J=1,8\text{Hz}$), 7.28 (1H, dd, $J=1,8\text{Hz}$), 6.76 (1H, t, $J=8\text{Hz}$), 5.1 2 (1H, s), 4.64 (1H, m), 4.40 (1H, ddd, $J=2,5,11\text{Hz}$), 3.78 (1H, dd, $J=11,11\text{Hz}$), 3.30 (1H, ddd, $J=2,5,13\text{Hz}$), 2.45 (1H, dd, $J=11,13\text{Hz}$)。

15 (9) ^{13}C —核磁気共鳴スペクトル：重ピリジンに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した結果は図4のとおりである。また各シグナルの化学シフト、多重度は次のとおりである。

δ 171.7(s), 142.6(s), 135.6(s), 124.8(d), 121.1(d), 116.6(d), 114.1(s), 92.3(s), 81.2(d), 72.0(t), 64.1(d), 45.9(t)。

さらに、本発明者らは、F-1490 物質に構造が類似する、式(I)において X が $-\text{CH}_2-$ を表わし、R が水素原子を表わす新規類縁体化合物（以下、F-20 1490-A と呼ぶ。）を合成し（後述の実施例2参照）、F-1490 物質と共にその生理活性を試験した。

本発明に係る F-1490 物質及び F-1490-A 物質は、優れた破骨細胞分化抑制活性を有しており、しかも、細胞に対する毒性が低いので破骨細胞の活性亢進に随伴する疾患、例えばがん細胞の骨転移、リウマチ性関節炎、骨粗鬆症 25 などの治療薬としての使用が期待される。

本発明に係る物質の破骨細胞分化抑制活性は、例えば、以下に述べる方法

により測定することができる。

C57BL/6 マウス（雌性、6 週令）から骨髓細胞を集め、24穴マイクロプレートに 10 % 胎仔牛血清、1 mM ピルビン酸、0.1 mM 非必須アミノ酸（ギブコ社）、500 μ M 2-メルカプトエタノール、200 ng/m1 副甲状腺ホルモン関連蛋白（PTHrP）、50 μ g/m1 L-アスコルビン酸を含む RPMI1640 培地で 1.5×10^6 個/ウェルとなるように調製して 1 mL ずつ撒くと同時に試験試料を適量添加する。培養後 2 及び 4 日目に培地の半量を試験試料を含む上記培地で交換する。培養 7 日目に培地を吸引除去し、アセトン：メタノール（1：1）液で細胞を固定後、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ陽性細胞を染色した。すなわち、染色液（0.1 mg/m1 Naphthol AS-MX phosphate（シグマ社）、0.6 mg/m1 Fast red violet LB sal（シグマ社）、20 mM 酒石酸を含む 0.2 M 酢酸緩衝液（pH5.2））を各ウェルに 0.4 mL 加え、37°C で 1 時間反応させる。発色後、破骨細胞への分化の指標である酒石酸耐性酸性フォスファターゼ陽性細胞数を顕微鏡下で測定する。

試験試料中に破骨細胞分化抑制に有効な物質が含まれる場合、酒石酸耐性フォスファターゼ陽性細胞の出現は抑制される。また試験試料の濃度に対する前記細胞数の変化により、この試験試料の有効な濃度域が求められる。

本発明の F-1490 物質及び F-1490-A 物質は下記表 1 に示すとおり、低濃度で骨髓細胞の破骨細胞への分化を抑制した。

表 1

濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	破骨細胞への分化阻害率(%)	
	F-1490 物質	F-1490-A 物質
0	0	0
0.20	6	2
0.78	50	63
3.10	69	74
12.50	98	87
50%阻害濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.78	0.65

また、本発明の F-1490 物質及び F-1490-A 物質は下記表 2 に示すとおり各種培養細胞に対してほとんど毒性を示さない。

表 2

細胞	50%増殖阻害濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	F-1490 物質	F-1490-A 物質
L1210	> 50	> 50
Colon26	> 50	> 50
B16BL6	> 50	> 50

5 なお、試験は、以下のとおり行なった。各種マウスがん細胞 (L1210 (白血病) 、 Colon26 (結腸がん) 、 B16BL6 (悪性黒色腫)) を 10% 胎仔牛血清を含む RPMI1640 培地を用いて、それぞれ 2×10^4 個 / ウエルとなるように調製し、96 穴マイクロプレートに 0.1mL ずつ撒いた。同時に所定量の F-1490 物質を添加し、37°C、5% CO₂ を含む空気下で 48 時間培養した。さら 10 に 0.5% の MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl] 2,5-biphenyl tetrazolium bromide) を 10 μL 加え 4 時間培養した。培養後、0.1mL の 10% SDS-0.01N 塩酸を加え、570 nm の吸光度を測定し、50% 増殖阻害濃度を求め

た。

図面の簡単な説明

図 1 は、F-1490 物質の KBr 法での赤外部吸収スペクトルである。

5 図 2 は、F-1490 物質のメタノール溶液での紫外外部吸収スペクトルである。

図 3 は、F-1490 物質の重ピリジン溶液での¹H-核磁気共鳴スペクトルである。

図 4 は、F-1490 物質の重ピリジン溶液での¹³C-核磁気共鳴スペクトルである。

10 図 5 は、F-1490-A 物質の重メタノール溶液での¹H-核磁気共鳴スペクトルである。

図 6 は、F-1490-A 物質の重メタノール溶液での¹³C-核磁気共鳴スペクトルである。

15 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明は以下の記載により限定されるものではない。

実施例 1 : F-1490 物質生産菌の培養と F-1490 物質の分離精製

20 カニングハメラ・エスピ (Cunninghamella sp.) F-1490 (FERM BP-8287) 株の斜面培地 (ポテトデキストロースアガーボード) から 1 白金耳を 50 ml の種母培地 (ポテト澱粉 2%、グルコース 1%、大豆粉 (エスサンミート: 味の素社製) 2%、リン酸二水素カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.05%、pH 無調整) を入れた 500 ml 容の三角フラスコに接種し、25°C で 2 日間ロータリーシェーカー上で培養して種培養液を得た。生産培地として水飴 4%、ペプトン (極東製薬社製) 2%、酵母エキス 1%、硫酸マグネシウム 0.5%、

リン酸二水素カリウム 0.9% からなる培地を用い、500 ml 容の三角フラスコにそれぞれ 60 ml を入れて殺菌後、種培地を 1% ずつ接種した。25℃で4日間ロータリーシェーカー上で培養した後、得られた培養液 20 L を遠心分離器にかけ、培養液及び菌体に分離した。

5 得られた培養液を 6 N 塩酸で pH 2 に調整後、水で平衡化した 5 L の吸着樹脂ダイヤイオン (Diaion) HP-20 (三菱化学社製) カラムに通過させた。活性成分が吸着された HP-20 カラムを 20% メタノール水 10 L で洗浄した後、メタノール 10 L で活性成分を溶出した。溶出液よりエバポレーターでメタノールを留去し、酢酸エチル 2 L を加え攪拌した。この酢酸エチル層を 10 とり、水 2 L 加えて攪拌しながら、1 N 水酸化ナトリウム水溶液で pH 8 に調整した。静置し、二層に分離した後、水層を分取し、1 N 塩酸で pH 2 に調整した。さらに酢酸エチル 2 L を加えて抽出した後、酢酸エチル層を減圧濃縮して褐色油状物質 6.1 g を得た。

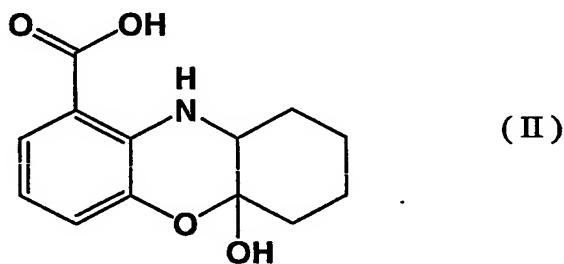
この褐色油状物質を少量のメタノールに溶解してシリカゲルにまぶし、クロロホルムで充填した 400 ml 容のシリカゲルカラムに供した。クロロホルム-メタノール混合液 (15:1) 1 L で洗浄後、クロロホルム-メタノール混合液 (10:1) 1 L で溶出した。このようにして得られた活性画分を減圧濃縮して黄色油状物質 0.39 g を得た。さらにこれを少量のメタノールに溶解してシリカゲルにまぶし、トルエンで充填したシリカゲルカラム (5 20 0 ml) に供した。トルエン-アセトン混合液 (3:1) 150 ml で洗浄後、トルエン-アセトン混合液 (2:1) 150 ml で溶出した。活性物質を含む画分を集めて減圧濃縮し、黄色粉状物質 106 mg を得た。

このようにして得た黄色粉状物質を少量のメタノールに溶解し、200 ml のセファデックス LH-20 カラム (ファルマシア社製) に供し、メタノールで溶出した。活性画分を集めて減圧濃縮し、F-1490 物質 20 mg を得た。

実施例 2 : F-1490-A 物質の合成

3-ヒドロキシアントラニル酸 100 mg 及び 1, 2-シクロヘキサンジオン 400 mg のメタノール 20 ml 懸濁液に氷冷下、攪拌しながら水素化ホウ素ナトリウム 1 g を少量づつ 30 分間で加えた。添加終了後、1 時間室温で攪拌した後再び氷冷し、1 N 塩酸を加え pH 7 に調整し、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をプレパラティブ TLC (ヘキサン-酢酸エチル 1 : 1) によって、R_f 値 0.6 にリンモリブデン硫酸で加熱下で呈色する単一バンドを精製し、90 mg の目的物 F-1490-A を得た。

10 ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR スペクトルから F-1490-A 物質は以下に示す構造を有することが明らかとなった。

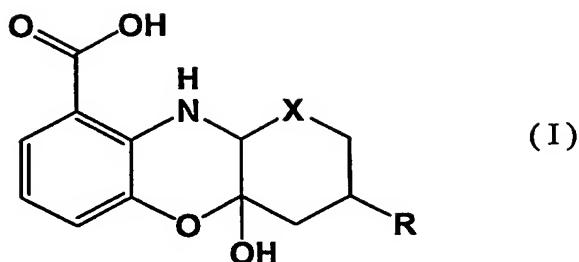


産業上の利用可能性

15 F-1490 物質及び F-1490-A 物質は、優れた破骨細胞分化抑制活性を有し、また培養細胞に対する毒性が低いので、破骨細胞の活性亢進に随伴する疾患への治療薬としての利用が期待できる。

請求の範囲

1. 式 (I)



5 (式中、Xは $-\text{O}-$ または $-\text{CH}_2-$ を表わし、Rは、Xが $-\text{O}-$ のときは水酸基を表わし、Xが $-\text{CH}_2-$ のときは水素原子を表わす。) で示される化合物またはその塩。

2. 式 (I) 中のXが-〇-を表わし、Rが水酸基を表わす請求の範囲1
10 に記載の化合物またはその塩。

3. 式 (I) 中の X が $-\text{CH}_2-$ を表わし、R が水素原子を表わす請求の範囲 1 に記載の化合物またはその塩。

15 4. カニングハメラ (*Cunninghamella*) 属に属し、請求の範囲 2 記載の化合物を生産する能力を有する微生物を培養して、その培養物から請求の範囲 2 記載の化合物を採取することを特徴とする請求の範囲 2 記載の化合物の製造方法。

20 5. 請求の範囲 2 記載の化合物を生産する能力を有するカニングハメラ・
エスピー (*Cunninghamella* sp.) F-1490 株 (FERM BP-8287)。

6. 請求の範囲 1 記載の化合物またはその塩を有効成分とする破骨細胞分化抑制剤。

図 1

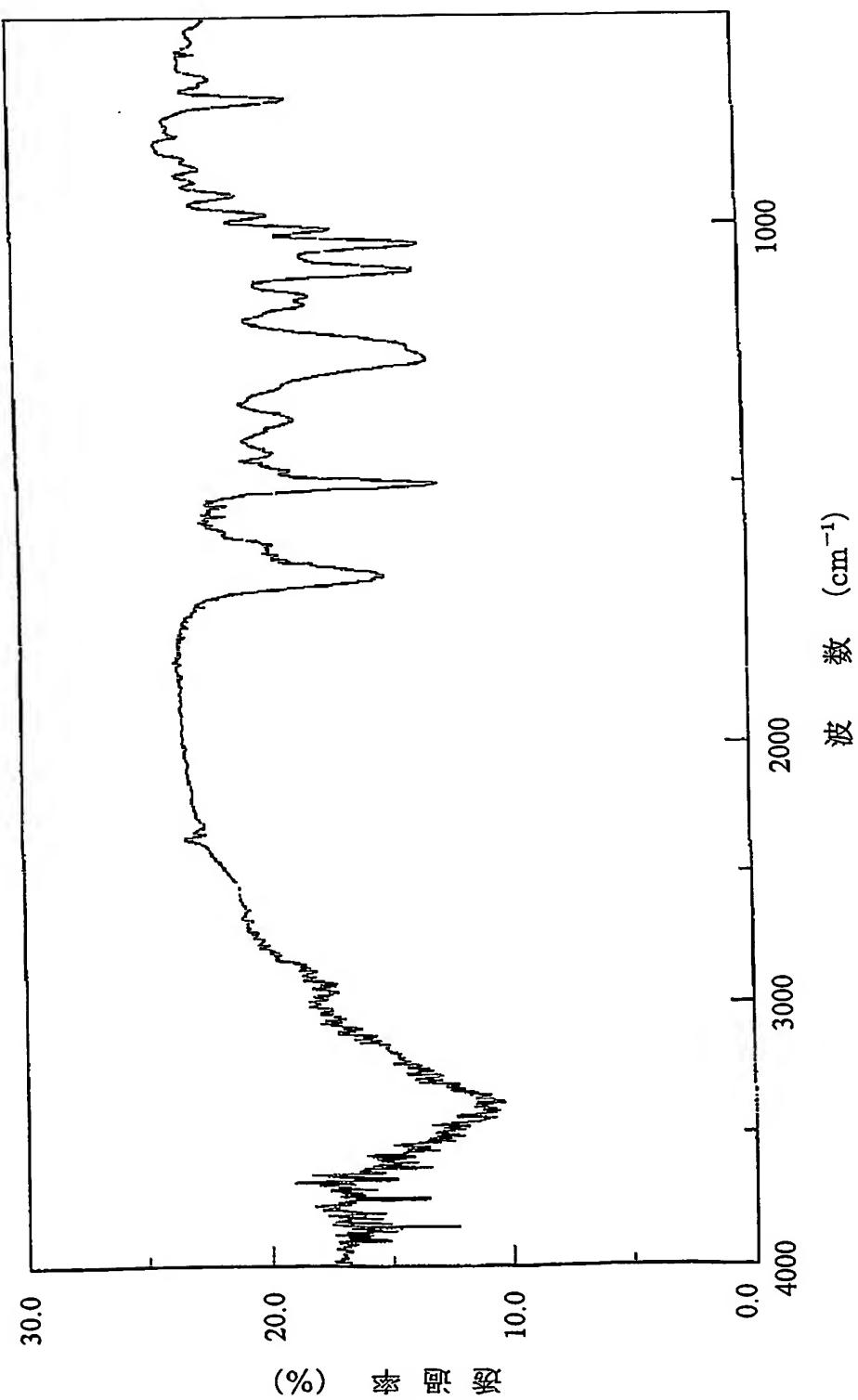


図 2

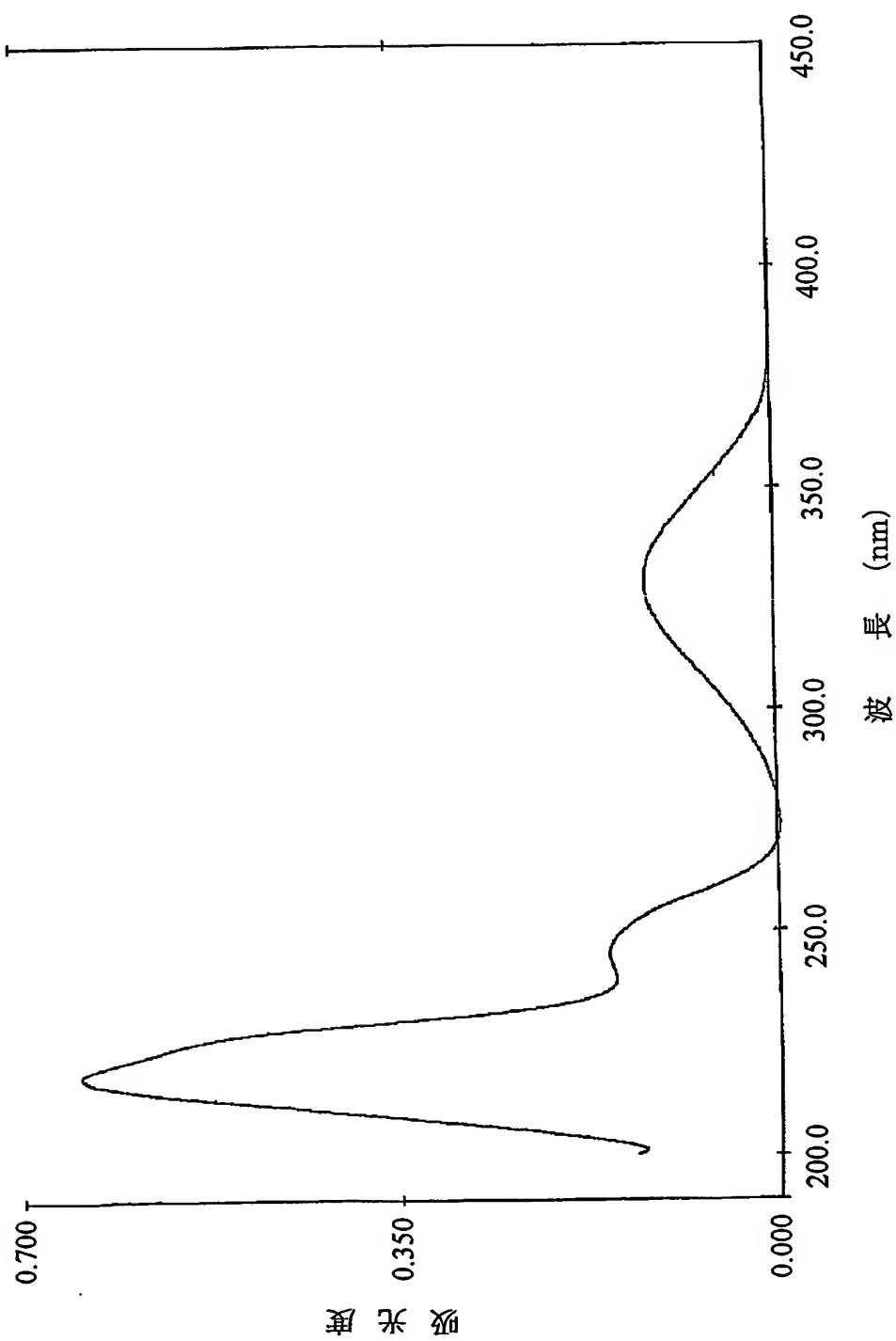


図 3

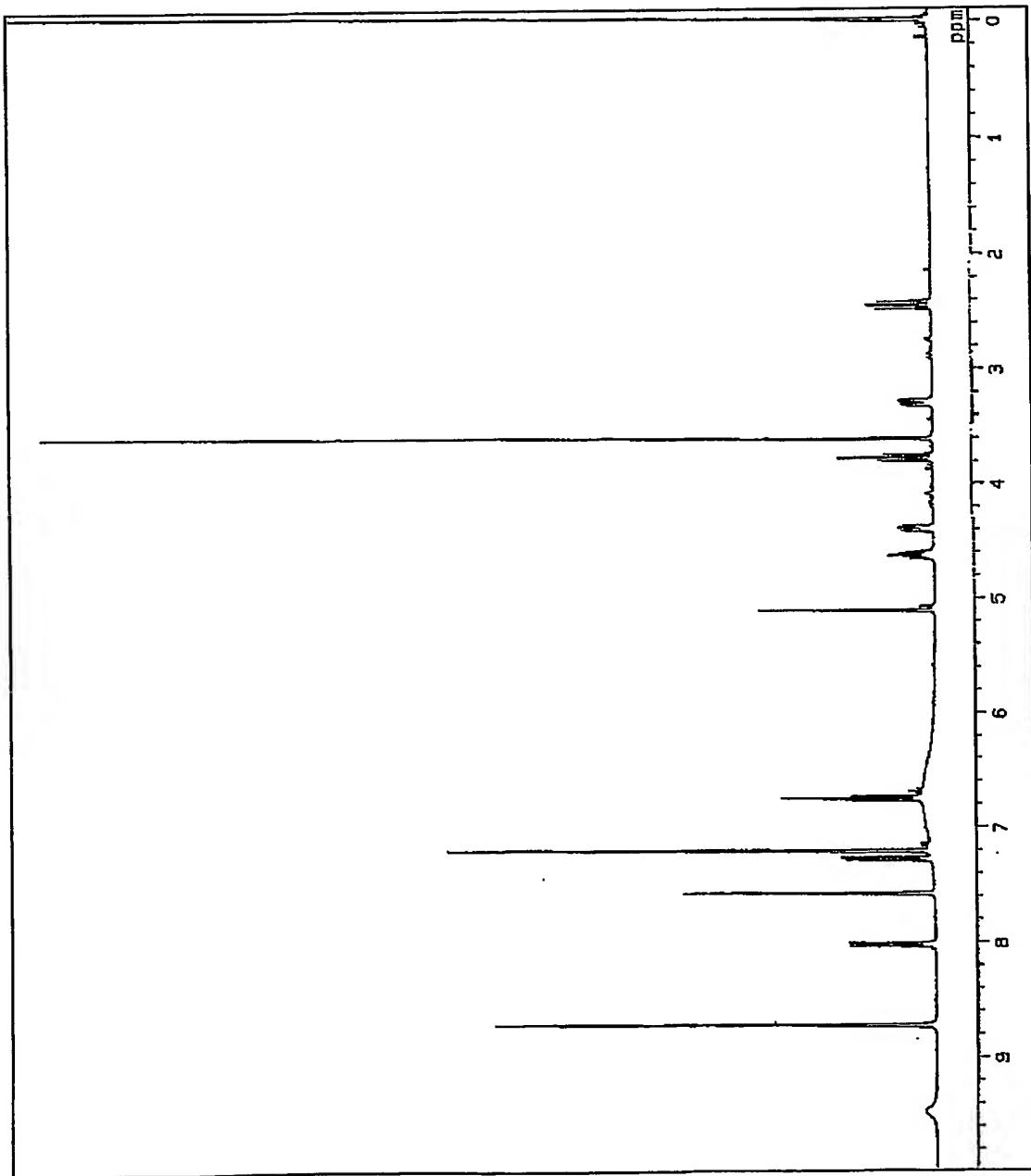


図 4

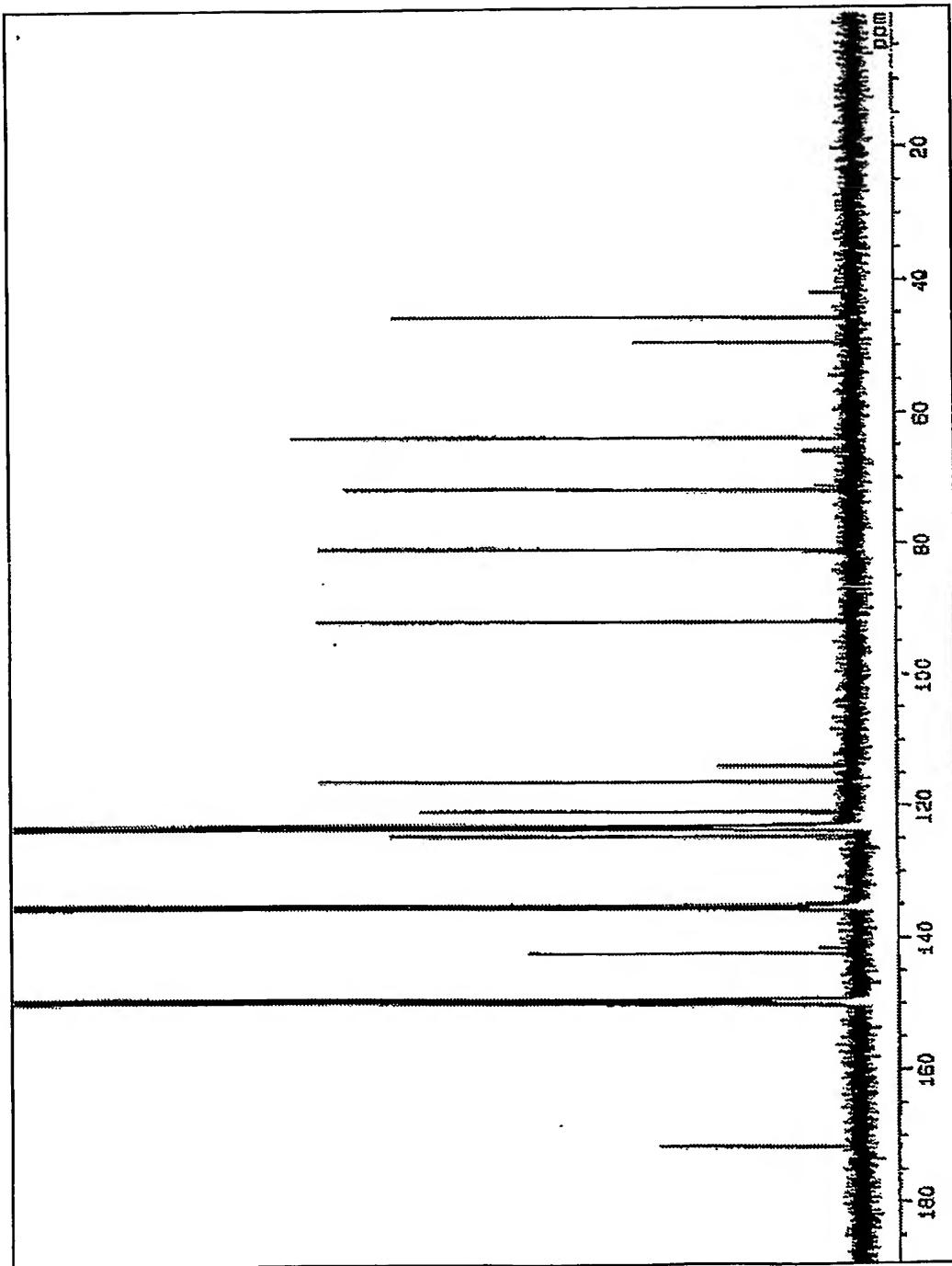


図 5

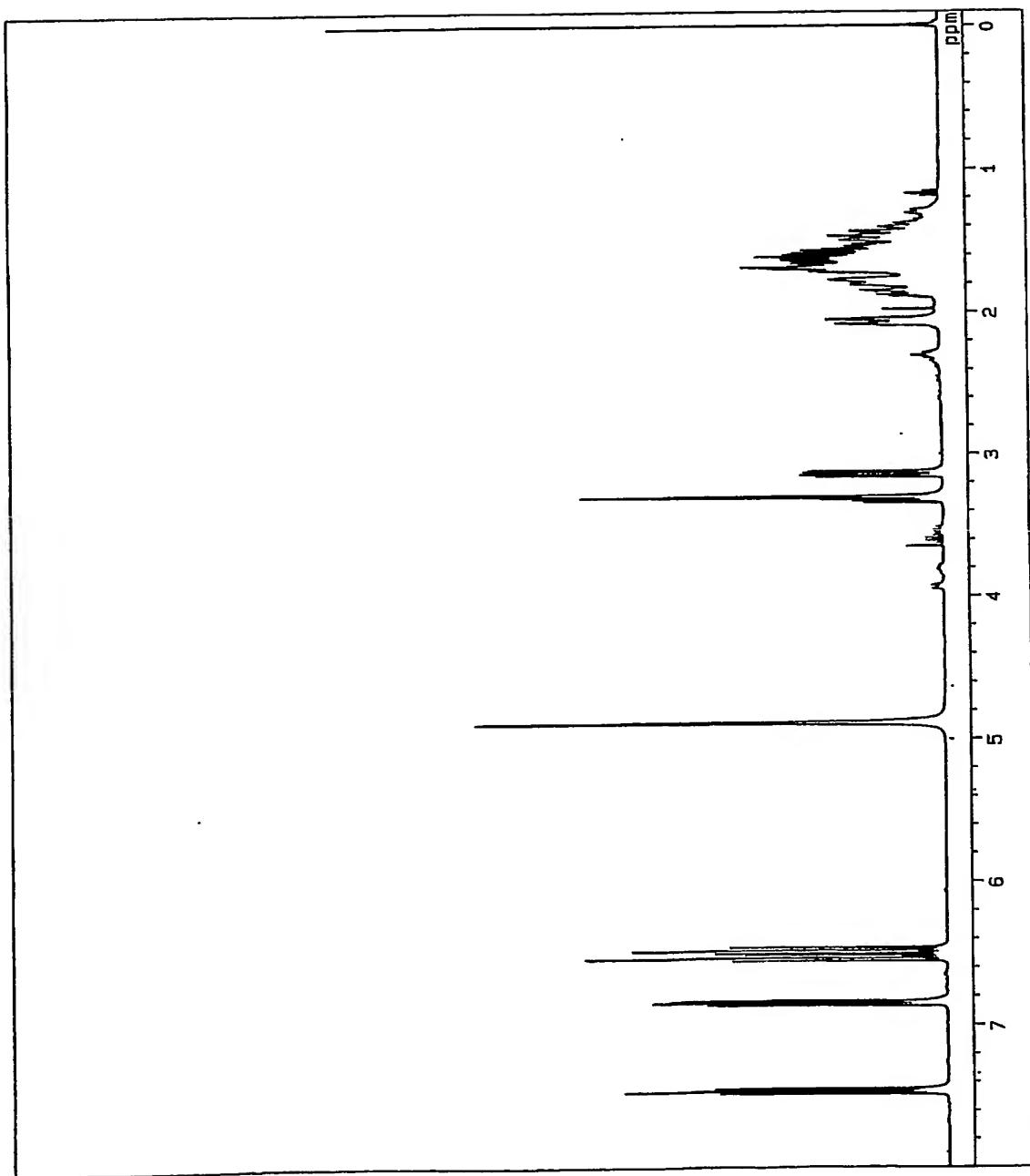
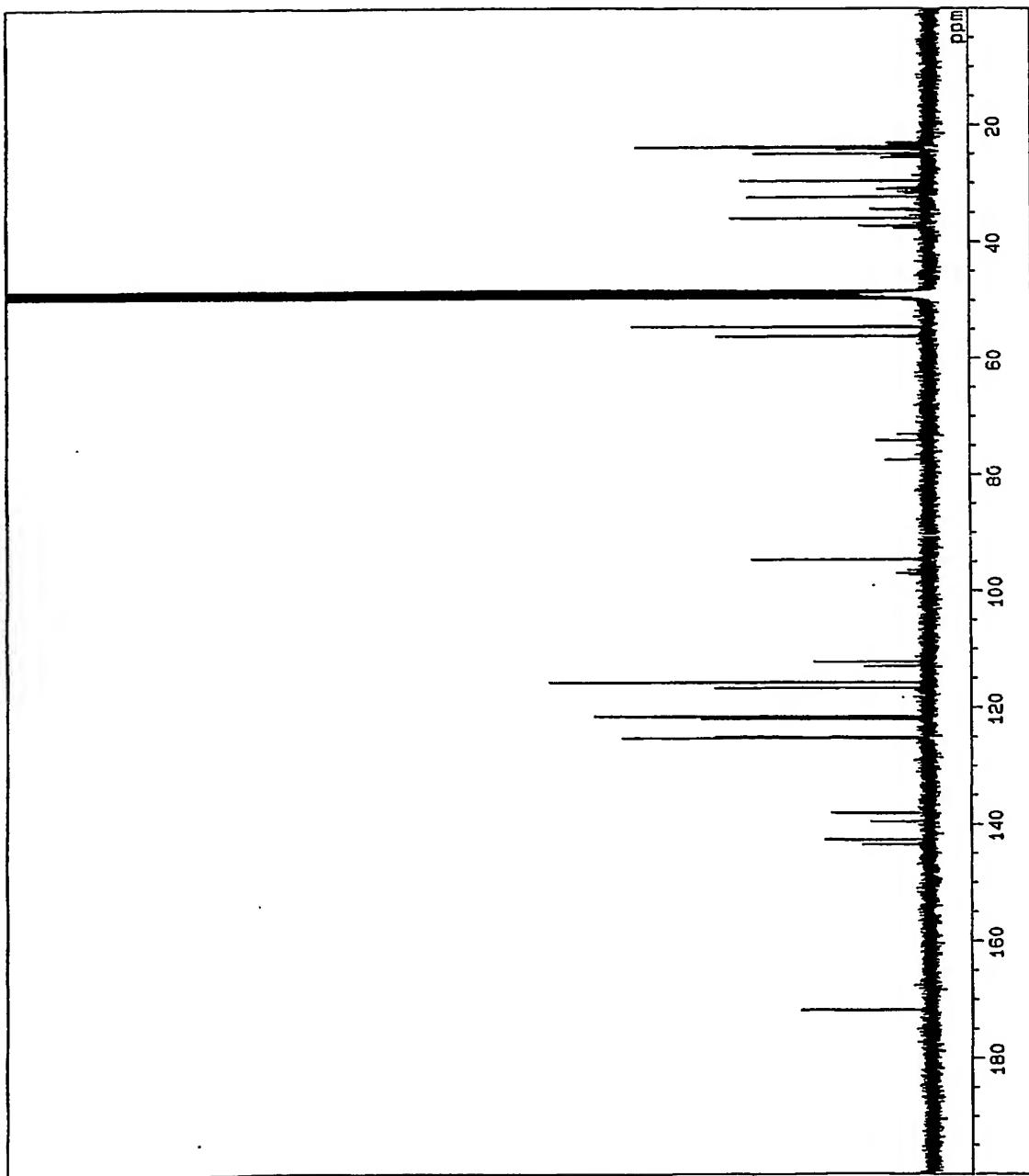


図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/02633

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12P17/18, 17/14, C07D265/38, 498/04, A61K31/5383,
A61P19/02, 19/10, 29/00, 35/00, 35/04, 43/00, C12N1/14//
(C12P17/18, C12R1:645) (C12P17/14, C12R1:645) (C12N1/14, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl' C12P17/00-17/18, C07D265/38, 498/04, C12N1/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEVINE S.G. et al., Structure of the o-Aminophenol-Adipoin Condensation Product. J.Org.Chem. 1976, Vol.41, No.25, pages 4026 to 4028	1-6
A	HERZIG C. et al., 2-Chlorooxirane als Synthone zur Darstellung sechsgliedriger Heterocyclen. Chem.Ber. 1981, Vol.114, No.6, pages 2348 to 2354	1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
02 April, 2003 (02.04.03)Date of mailing of the international search report
15 April, 2003 (15.04.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12P 17/18, 17/14, C07D 265/38, 498/04, A61K 31/5383, A61P 19/02, 19/10, 29/00, 35/00, 35/04, 43/00, C12N 1/14//(C12P 17/18, C12R 1:645) (C12P 17/14, C12R 1:645) (C12N 1/14, C12R 1:645)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12P 17/00-17/18, C07D 265/38, 498/04, C12N 1/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN), JICST ファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LEVINE S. G. et al. Structure of the <i>o</i> -Aminophenol-Adipoin Condensation Product. J. Org. Chem. 1976, Vol. 41, No. 25, p. 4026-4028	1-6
A	HERZIG C. et al. 2-Chlorooxirane als Synthone zur Darstellung sechsgliedriger Heterocyclen. Chem. Ber. 1981, Vol. 114, No. 6, p. 2348-2354	1-6

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.04.03

国際調査報告の発送日

15.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三原 健治

4N 2937



電話番号 03-3581-1101 内線 3488